

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 89–96

Eine einfache gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Barbituraten im Serum

Von W. R. Külpmann¹⁾

Institut für Klinische Chemie (geschäftsf. Direktor Prof. Dr. Dr. J. Büttner) Medizinische Hochschule Hannover

(Eingegangen am 3. Juli/19. September 1978)

Zusammenfassung: Es wird ein einfaches gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung der in Deutschland als Schlafmittel handelsüblichen Barbiturate im Serum beschrieben. Die Probe wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) gelöst und ein aliquoter Teil in den Gaschromatographen injiziert. Der Variationskoeffizient für die Präzision in der Serie schwankt zwischen 3,0 und 7,2%. Die Wiederfindung beträgt – unter Ausschluß von Propallylonal – zwischen 91 und 108%. Für die Nachweisgrenze werden Werte zwischen 1,7 und 6,9 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Die Spezifität wird überprüft durch Vergleich

1. der Werte vor und nach zusätzlicher dünnenschichtchromatographischer Reinigung der Extrakte sowie
2. der Retentionszeiten von etwa 100 verschiedenen Arzneimitteln in den verwendeten gaschromatographischen Systemen.

A simple gas chromatographic method for the determination of barbiturates in serum

Summary: A simple gas chromatographic method for the determination of commercially available barbiturates used as hypnotics is presented. Saturated ammonium sulfate is added to the serum sample. The mixture is extracted three times with chloroform. The organic layer is dried over sodium sulfate and evaporated. The residue is dissolved in ethyl acetate/acetic acid (100 ml + 1 ml) and an aliquot is injected into the gas chromatograph. The precision in the series is between 3.0 and 7.2%; the recovery – with the exception of propallylonal – between 91 and 108%; the detection limit from 1.7 to 6.9 $\mu\text{mol/l}$. The specificity of the method was checked by comparing

- 1) the results obtained before and after additional purification of the extract by thin-layer chromatography, and
- 2) the retention times of about 100 drugs in the gas chromatographic systems that are used.

Einleitung

Die für Diagnose, Therapie und Prognose von Vergiftungen wichtige Identifikation und quantitative Bestimmung der z. Zt. etwa 20 verschiedenen, als Schlafmittel in Deutschland handelsüblichen Barbitursäurederivate wird – abgesehen von massenfragmentographischen Verfahren – am besten mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt. Zum Gruppennachweis und zur quantitativen Bestimmung wird noch häufig die UV-Spektrophotometrie in verschiedenen Modifikationen empfohlen (1, 2). Eine Identifikation, die für die Wahl der Therapie wichtig sein kann, ist jedoch nicht möglich. Die Spezifität ist umstritten. Der Zeitbedarf ist, verglichen mit dem von uns entwickelten Verfahren,

nicht wesentlich geringer. Die ersten gaschromatographischen Verfahren zur Barbituratbestimmung sind mit den Namen *Brochmann-Hansen* und *Svendsen* (3, 4), *van den Heuvel* (5) und *Janak* (6) verknüpft. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, das Aufarbeitungsverfahren zu verbessern und eine möglichst vollständige Entfernung von störenden Begleitverunreinigungen rasch und ohne Barbituratverlust zu erreichen (z. B. 7, 8, 9). Die andere Schwierigkeit bei der Barbituratbestimmung, die nicht idealen gaschromatographischen Eigenschaften dieser Verbindungskategorie, wurde durch Derivatisierung der Substanzen (7, 8, 10, 11) oder durch Verbesserung des gaschromatographischen Trennungssystems zu meistern gesucht (12).

Die von uns zu erarbeitende Methode sollte bei einfacher, zeitsparender Aufarbeitung der Probe eine quantitative Bestimmung der z. Zt. in Deutschland handelsüblichen Barbiturate erlauben. Das gaschromatographische System

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie, 9.–11. März 1977, Aachen.

sollte so einfach wie möglich sein, um entsprechende Analysen in einem kleinen, der klinischen Chemie zugeordneten toxikologischen Labor ohne besonders geschulte Mitarbeiter auch unter Notfallbedingungen durchführen zu können. Eine umfassende Qualitätskontrolle, die man bei mancher früher publizierten Methode vermisst, sollte die Zuverlässigkeit der Bestimmung nachweisen.

Material und Methodik

Barbiturate

Allobarbitol	(5,5-Diallyl-barbitursäure) relative Molekülmasse M_r 208,2 (Chemipharma, Sulzbach)
Amobarbitol	(5-Ethyl-5-isopentyl-barbitursäure) M_r 226,3 (Thiemann, Lünen)
Aprobarbitol	(5-Allyl-5-isopropyl-barbitursäure) M_r 210,2 (Hoffmann-La Roche, Grenzach)
Barbitol	(5,5-Diethyl-barbitursäure) M_r 184,2 (Hoffmann-La Roche, Grenzach)
Brallobarbitol	(5-Allyl-5-(2-brom-allyl)-barbitursäure) M_r 287,1 (UCB-Chemie, Sindorf)
Butalbitol	(5-Allyl-5-isobutyl-barbitursäure) M_r 224,2 (Sandoz, Nürnberg)
Crotarbitol	(5-Ethyl-5-crotyl-barbitursäure) M_r 210,2 (Asta-Werke, Brackwede)
Cyclobarbitol	(5-Ethyl-5-(cyclohex-1-en-yl)-barbitursäure) M_r 236,3 (Bayer, Leverkusen)
Cyclopal	(5-Allyl-5-(cyclopent-2-en-1-yl)-barbitursäure) M_r 234,2 (Siegfried, Säckingen)
Heptabarbitol	(5-Ethyl-5-(cyclohept-1-en-yl)-barbitursäure) M_r 250,3 (Thomae, Biberach an der Riß)
Hexobarbitol	(5-(Cyclohex-1-en-yl)-1,5-dimethyl-barbitursäure) M_r 236,3 (Bayer, Leverkusen)
Methylphenobarbitol	(5-Ethyl-1-methyl-5-phenyl-barbitursäure) M_r 246,3 (Merck, Darmstadt)
Pentobarbitol	(5-Ethyl-5-(1-methyl-butyl)-barbitursäure) M_r 226,3 (Desitin, Hamburg)
Phenobarbitol	(5-Ethyl-5-phenyl-barbitursäure) M_r 232,2 (Asche, Hamburg)
Propallylonal	(5-Isopropyl-5-(2-brom-allyl)-barbitursäure) M_r 289,1 (Cassella-Riedel, Frankfurt/M.)
Secbutabarbitol	(5-Ethyl-5-(1-methyl-propyl)-barbitursäure) M_r 212,3 (Asche, Hamburg)
Secobarbitol	(5-Allyl-5-(1-methyl-butyl)-barbitursäure) M_r 238,3 (Asche, Hamburg)
Vinylbitol	(5-(1-Methyl-butyl)-5-vinyl-barbitursäure) M_r 234,2 (Byk-Gulden, Konstanz)

Die Barbiturate werden einzeln in Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) gelöst. Die Endkonzentration beträgt 1 g/l. Die Lösung ist bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die obengenannten Barbiturate wurden von den angegebenen Firmen kostenlos zur Verfügung gestellt.

[2-¹⁴C]Hexobarbitol wird von NEN, Dreieichenhain bezogen. Spezifische Aktivität 317,5 GBq/mol (8,58 mCi/mmol). Das Barbiturat wird regelmäßig alle 3 Monate mit Hilfe der Radio-dünnschichtchromatographie auf Reinheit untersucht. Die Gebrauchslösung enthält 7,4 MBq/l (200 µCi/l) Ethanol.

Natriumsulfat p. a., Ammoniumsulfat p. a., Ameisensäure, Ammoniak (mind. 250 g/kg) p. a., Eisessig p. a., Toluol p. a. und Ethanol abs. werden wie von Merck, Darmstadt geliefert benutzt.

Ethylacetat, Chloroform, Aceton und Methanol (Merck, Darmstadt) werden vor Gebrauch destilliert.

Als Szintillatorlösung für die Flüssigszintillationsspektrometrie werden benutzt: 5 g 2,5-Diphenyloxazol und 100 mg 2,2'-p-Phenylenebis (5-phenyloxazol) (jeweils Merck, Darmstadt) in 1 l Toluol.

Glasgeräte: Schliffzentrifugenröhrchen mit spitzem Boden, Inhalt 25 ml.

Glassäulen: Typ 1: 12 cm lang, 1 cm Innendurchmesser mit eingeschmolzener Glasfritte (G2) ohne Hahn.

Typ 2: 12 cm lang, 1 cm Innendurchmesser mit eingeschmolzener Glasfritte (G4) und Teflonhahn.

Für die Dünnschichtchromatographie werden DC-Alufolien (20 x 20 cm²) benutzt, die mit Kieselgel 60 (Schichtdicke 0,25 mm) beschichtet sind und einen Fluoreszenzindikator F₂₅₄ enthalten (Merck, Darmstadt).

Vor Gebrauch werden die Platten 24 Stunden mit Chloroform/Aceton (80 ml + 20 ml) im Durchlauftank nach Truter (13) gewaschen. Zum Nachweis der Barbiturate wird mit Quecksilbersulfat/Diphenylcarbazol angesprüht (14).

Für die Gaschromatographie werden zwei Geräte der Firma Varian, Darmstadt benutzt: Modell 1400 und 2800, beide ausgerüstet mit Flammenionisationsdetektor.

Trägergas: Nachgereinigter Stickstoff (35 ml/min).

Brenngase: Nachgereinigter Wasserstoff und synthetische Luft.

Glassäulen, 1,8 m lang, 2 mm Innendurchmesser, silikonisiert.

Als stationäre Phasen werden verwendet:

1. 3% SP 2250 DA auf Chromosorb WHP, 100–120 mesh
2. 3% CDMS auf Chromosorb WHP, 100–120 mesh
3. 3% OV-101 auf Chromosorb WHP, 100–120 mesh

(Supelco, Bellefonte, Pa, USA). Nur das Säulenende wird mit silikonisierter Watte verschlossen. Die Gaschromatographie wird an der Säule 1 bei einer Temperatur von 190 °C, an Säule 2 bei 230 °C und an Säule 3 bei 185 °C durchgeführt; Säuleneinlaßteil und Detektor werden auf eine jeweils 30 °C höhere Temperatur eingestellt.

Flüssigszintillationsspektrometrie:

Die Messung der Proben erfolgt mit einem Packard Tricarb Modell 3380 (Packard, Frankfurt).

Die Reinheit der verwendeten radioaktiven Barbiturate wird in 3-monatigen Abständen mit einem Radiodünnschichtchromatographen (Modell 2722 der BF-Vertriebs GmbH, Karlsruhe) überprüft.

Die Berechnungen werden durchgeführt mit dem „Statistics Calculator“ (Hewlett Packard, Frankfurt).

Methodik

1 ml Serum wird in ein Schliffzentrifugenröhrchen pipettiert und mit 2 ml kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt (Abb. 1). Es wird mit 5 ml Chloroform 1 Minute geschüttelt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 3000 g wird die organische Phase auf eine mit etwa 3 g Natriumsulfat gefüllte Glassäule (Typ 1) gegeben. Das nach Durchlauf wasserfreie Eluat wird in einem Spitzröhrchen aufgefangen. Die Extraktion wird wie beschrieben zweimal wiederholt. Die vergingenen wasserfreien Eluate werden am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur des Wasserbades eingedampft, um den Nachweis auch von leicht flüchtigen Hypnotica zu gewährleisten (15). Die Wand des Röhrchens wird sorgfältig mit etwa 1 ml Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) nachgewaschen und das Lösungsmittel wie angegeben eingedampft. Der trockene Rückstand wird in 100 µl Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) aufgenommen.

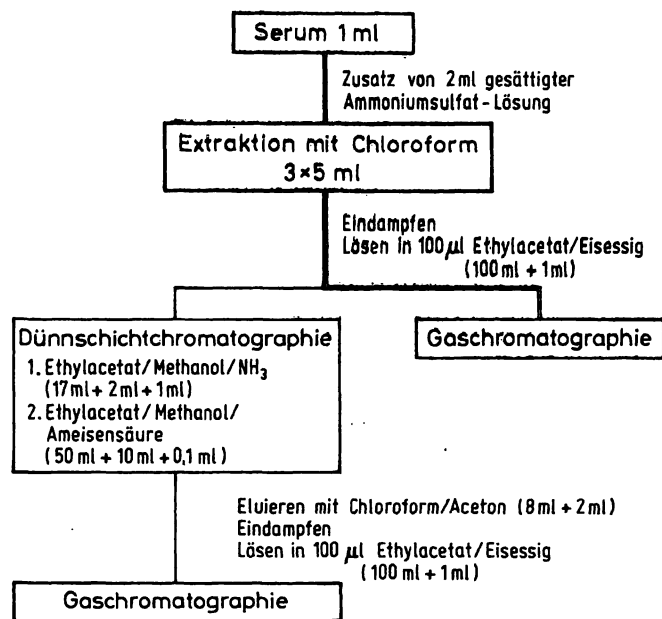


Abb. 1. Gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum. Aufarbeitungsschema.

1. 3% SP 2250 DA auf Chromosorb WHP 100–120 mesh; Säulentemperatur 190 °C.
2. 3% CDMS auf Chromosorb WHP 100–120 mesh; Säulentemperatur 230 °C.
3. 3% OV-101 auf Chromosorb WHP 100–120 mesh; Säulentemperatur 185 °C.

Zur gaschromatographischen Analyse werden je 2 µl an den Phasen SP 2250 DA und CDMS chromatographiert. Zur Identifikation wird die relative Retentionszeit in Bezug auf Hexobarbital benutzt (Tab. 1). Die Zuordnung wird überprüft durch gleichzeitige Injektion der Probe und des vermuteten Barbiturates. Das Barbiturat gilt als identifiziert, wenn an beiden Phasen die Peakhöhe der fraglichen Substanz der Menge des zugesetzten Standards entsprechend zunimmt bei Konstanz der Halbwertsbreite. In seltenen Zweifelsfällen, z. B. bei der Unterscheidung zwischen Butalbital und Secbutabarbital wird zusätzlich die Phase OV-101 benutzt. Zur quantitativen Bestimmung werden 3 verschiedene Mengen des betreffenden Barbiturates injiziert, die etwa der in dem aliquoten Teil der Probe enthaltenen Menge entsprechen. Dazu wird die Phase benutzt, die aufgrund der vorangegangenen Identifikation die kleinere Menge an Barbiturat in der Probe angezeigt hat. Aus der Regressionsgeraden der Peakhöhen des Standards wird die injizierte Menge an Barbiturat in der Probe errechnet.

Tab. 1. Relative Retentionszeit freier Barbiturate bezogen auf Hexobarbital.

Barbiturat	SP 2250 DA	CDMS	OV-101
Allobarbital	0,40	1,00	0,38
Amobarbital	0,51	0,97	0,59
Aprobarbital	0,41	0,94	0,42
Barbital	0,29	0,70	0,27
Brallobarbital	1,16	3,25	1,00
Butalbital	0,46	0,97	0,50
Crotarbital	0,42	0,88	0,44
Cyclobarbital	1,69	3,13	1,57
Cyclopal	1,12	2,45	1,05
Heptabarbital	2,32	4,08	2,14
Hexobarbital	1,00	1,00	1,00
Methylphenobarbital	1,20	1,45	1,11
Pentobarbital	0,57	1,12	0,66
Phenobarbital	1,89	5,10	1,48
Propallylonal	1,22	3,12	1,12
Secbutabarbital	0,47	0,97	0,56
Secobarbital	0,67	1,28	0,79
Vinylbital	0,60	1,26	0,63

Bei zusätzlicher dünnsschichtchromatographischer Vorreinigung der Probe wird wie folgt verfahren:

Der in Ethylacetat/Eisessig gelöste Rückstand wird quantitativ strichförmig auf eine DC-Platte aufgetragen. Von der Probe getrennt werden je 30 µg Phenobarbital und Hexobarbital aufgetragen, die in dem verwendeten Laufmittelgemisch (Ethylacetat/Methanol/Ammoniak (250 g/kg mind.) 170 ml + 20 ml + 10 ml) am langsamsten bzw. am schnellsten wandern. Nach der Entwicklung wird die barbiturathaltige Zone mit Hilfe der Standards unter dem UV-Licht lokalisiert. Der Teil der Platte, der die Reinsubstanz trägt, wird abgeschnitten. Das anschließende Durchlaufchromatogramm (16) im System Ethylacetat/Methanol/Ameisensäure (50 ml + 10 ml + 0,1 ml) benötigt 10 Minuten. Die Vollständigkeit der Entwicklung wird mit getrennt aufgetragenem Phenobarbital (30 µg) überprüft. Die schmale barbiturathaltige Bande der Probe wird abgeschnitten und in einer Glassäule (Typ 2) mit etwa zweimal 5 ml Chloroform/Aceton (8 ml + 2 ml) eluiert. Die vereinigten Eluate werden bei 20–25 °C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer eingedampft. Die Wand des Röhrchens wird mit etwa 1 ml Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) abgespült, und die Lösung erneut zur Trockene gebracht.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wird mit 100 µl Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) aufgenommen, und 10 µl werden in das mit 10 ml Szintillatorlösung vorbereitete Meßgefäß gegeben. Das restliche Volumen steht für die gaschromatographische Analyse zur Verfügung.

Ergebnisse

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie werden jeweils 2 ml eines zufällig ausgewählten, barbituratfreien Serums mit je 20 µg eines oder mehrerer Barbiturate aufgestockt. Außerdem werden 0,85 nmol (200 ng) Hexobarbital und 740 Bq (20 nCi) [2-¹⁴C]Hexobarbital zugesetzt. Je 1 ml der aufgestockten Probe wird getrennt aufgearbeitet und analysiert. Unter Berücksichtigung der Wiederfindung werden die in Tabelle 2 enthaltenen

Tab. 2. Gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum an SP 2250 DA. Präzision in der Serie unter Berücksichtigung der Wiederfindung von [2-¹⁴C]Hexobarbital.

Barbiturat	Anzahl der Analysen	Sollwert	Mittelwert	Variationskoeffizient
	n	(µmol/l)	(µmol/l)	VK (%)
Allobarbital	8	48,0	50,1	3,4
Amobarbital	8	44,2	45,5	3,2
Aprobarbital	8	47,6	49,5	3,0
Barbital	10	54,3	50,8	3,9
Brallobarbital	10	34,8	38,3	5,2
Butalbital	10	44,6	45,6	3,9
Crotarbital	8	47,6	51,4	7,2
Cyclobarbital	8	42,3	46,8	4,0
Cyclopal	8	42,7	44,0	5,4
Heptabarbital	8	40,0	41,5	6,3
Hexobarbital	8	42,3	50,0	5,8
Methylphenobarbital	8	40,6	42,0	6,5
Pentobarbital	8	44,2	47,4	6,0
Phenobarbital	8	43,1	44,3	6,8
Propallylonal	10	34,6	43,2	4,9
Secbutabarbital	10	47,1	47,2	3,2
Secobarbital	10	42,0	44,9	5,5
Vinylbital	10	42,7	45,4	3,6

Werte gefunden. Bei Zusatz von 5 bzw. 20 µg je ml Serum ergeben sich ähnliche Resultate. Die Präzision von Tag zu Tag wird für Phenobarbital ermittelt (Konzentration 86,2 µmol/l): Bei 13 Analysen an 13 verschiedenen Tagen beträgt der Mittelwert 86,2 µmol/l und der Variationskoeffizient (VK) 5,1%.

Richtigkeit und Spezifität

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung werden zufällig ausgewählte Seren wie beschrieben aufgestockt. Die Wiederfindung ist in Tabelle 3 dargestellt. Ohne Berücksichtigung der Verluste an radioaktiv markiertem Hexobarbital weichen die Ergebnisse um - 8,7 bis + 8,2% vom Sollwert ab. Propallylonal wird um 21,6% zu hoch bestimmt. Bei Abzug des Zusatzes an [2-¹⁴C]Hexobarbital beträgt die Abweichung vom Sollwert für Hexobarbital + 5,4%. Die Wiederfindung von [2-¹⁴C]Hexobarbital beträgt bei 186 Analysen im Mittel 95 ± 2,8%.

Leider steht bisher keine Referenzmethode zur Messung der einzelnen Barbiturate im Serum zur Verfügung. Vergleichsweise konnte lediglich Phenobarbital in 57 verschiedenen Seren von Anfallskranken, die mit Primidon behandelt wurden, mit Hilfe der „enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT)“ und der vorliegenden Methode (ohne Dünnschichtchromatographie) analysiert werden (17). Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$y = 0.95 x + 1.39$$

der Korrelationskoeffizient beträgt 0,968.

Tab. 3. Gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum an SP 2250 DA. Wiederfindung ohne Berücksichtigung der Wiederfindung von [2-¹⁴C]Hexobarbital.

Barbiturat	Anzahl der Analysen	Sollwert	Mittelwert	Abweichung vom Sollwert
	n	(µmol/l)	\bar{x} (µmol/l)	Δ %
Allobarbitat	8	48,0	47,4	- 1,3
Amobarbitat	8	44,2	43,0	- 2,6
Aprobarbitat	8	47,6	47,5	- 0,2
Barbital	10	54,3	49,6	- 8,7
Brallobarbitat	10	34,8	36,4	+ 4,4
Butalbitat	10	44,6	42,1	- 5,7
Crotarbitat	8	47,6	47,1	- 1,0
Cyclobarbitat	8	42,3	44,5	+ 5,1
Cycopal	8	42,7	39,9	- 6,5
Heptabarbitat	8	40,0	38,0	- 4,9
Hexobarbitat	8	42,3	45,8	+ 8,2
Methylphenobarbitat	8	40,6	38,4	- 5,3
Pentobarbitat	8	44,2	43,4	- 1,7
Phenobarbitat	8	43,1	41,4	- 3,9
Propallylonal	10	34,6	42,1	+ 21,6
Secbutabarbitat	10	47,1	46,0	- 2,4
Secobarbitat	10	42,0	41,4	- 1,4
Vinylbitat	10	42,7	43,2	+ 1,1

Spezifität

Der Zusatz der gesättigten Ammoniumsulfatlösung vor der Extraktion mit Chloroform verbessert die Spezifität der Methode. In der Abbildung 2 sind die Gaschromatogramme eines barbituratfreien Serums bei Extraktion ohne und nach Zusatz von Ammoniumsulfatlösung dargestellt. Bei der gewählten Registrierempfindlichkeit ergibt 1,28 nmol (300 ng) Hexobarbital Vollausschlag.

Für die Spezifität der Methode sprechen auch die folgenden Ergebnisse:

1. Bei der Verwendung des von uns angegebenen Extraktionsverfahrens bietet auch die Analyse von hämolytischen, ikterischen, lipämischen und urämischen Seren keine besonderen Schwierigkeiten. In keinem Fall wurde in diesen Proben ein Peak beobachtet, der fälschlich auf Grund seiner Retentionszeit als Barbiturat identifiziert wurde.
2. Bei Doppelanalysen kann die Standardabweichung auch gemäß folgender Formel berechnet werden (18):

$$s_d = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i1} - y_{i2})^2}{2n}}$$

n = Anzahl der Wertepaare

Vergleicht man die Variationskoeffizienten unter Verwendung von s und s_d , so ergeben sich nur geringe Unterschiede. Es kann daraus abgeleitet werden, daß das Extraktionsverfahren aus den verschiedenen

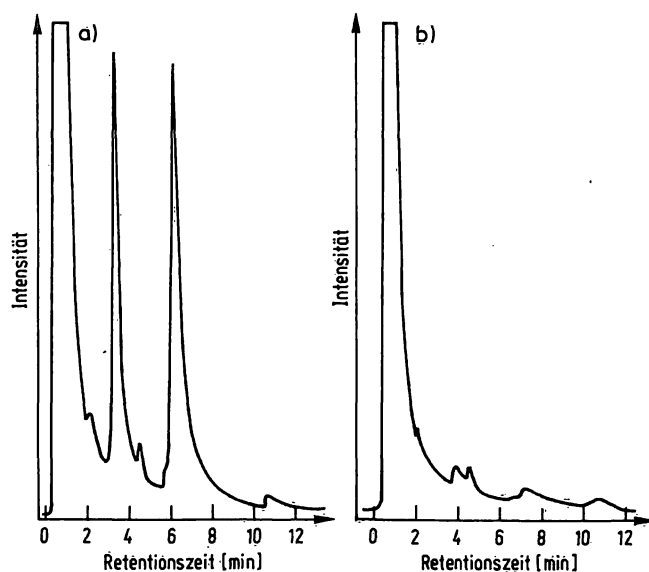


Abb. 2. Gaschromatogramm eines schlafmittelfreien Serums an SP 2250 DA

- a) nach Extraktion mit Chloroform ohne Zusatz von Ammoniumsulfatlösung.
- b) nach Extraktion mit Chloroform und Zusatz von Ammoniumsulfatlösung.

individuellen Serumproben störende Begleitverunreinigungen in gleicher Weise entfernt.

3. Es werden gegenübergestellt die Resultate von Barbituratbestimmungen in „echten“ Proben vor und nach vorangehender dünn-schichtchromatographischer Reinigung. Die „echten“ Proben erlauben eine Aussage darüber, ob die betreffende Methode in Gegenwart der verschiedenen Metabolite des Pharmakons richtige Werte ergibt, ob sie spezifisch ist. Die Proben stammen z. T. von vergifteten Personen, z. T. von vergifteten Ratten. Den Tieren aus zwei verschiedenen Stämmen (Lewis Freiburg und DA) werden die Barbiturate in ethanolischer Lösung intraperitoneal appliziert. Nach verschiedenen Zeiten (zwischen 1 und 3 Stunden) werden die Blutproben durch Dekapitation gewonnen. Die Konzentration in den „echten“ Proben wird vor und nach Dünn-schichtchromatographie an zwei verschiedenen Gaschromatographiephasen bestimmt. Vergleicht man das Ergebnis der Analyse ohne Dünn-schichtchromatographie mit den Resultaten, die nach zusätzlicher dünn-schichtchromatographischer Reinigung gewonnen werden, stellt man bereits bei therapeutischen und niedrigen toxischen Konzentrationen eine befriedigende Übereinstimmung fest (Tab. 4). Typische Gaschromatogramme sind auf den Abbildungen 3–5 dargestellt.

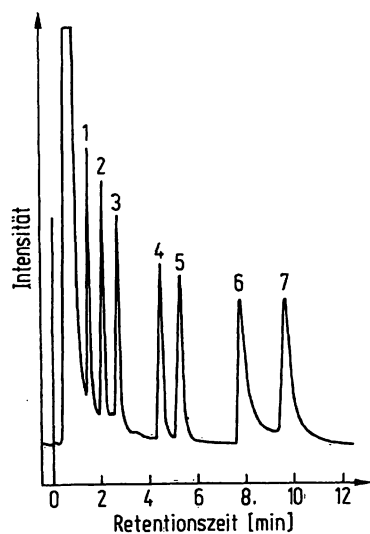


Abb. 3. Gaschromatogramm eines Barbituratgemisches (200 ng je Barbiturat) an SP 2250 DA.

1: Barbital, 2: Crotarbital, 3: Pentobarbital, 4: Hexobarbital, 5: Methylphenobarbital, 6: Phenobarbital, 7: Heptabarbital.

4. Es werden die folgenden verschiedenen Medikamente als Störsubstanzen überprüft:

Acidum acetylosalicylicum, Acidum ascorbicum, Acidum niflumicum, Adipidon (Methylglucaminsalz (5 ml)), Allopurinol, Amidotrizoesäure (Methylglucaminsalz (5 ml)), Aminophenazon, Amitryptilin, Ampicillin, Antazolin, Azapropazon, Benzbromaron,

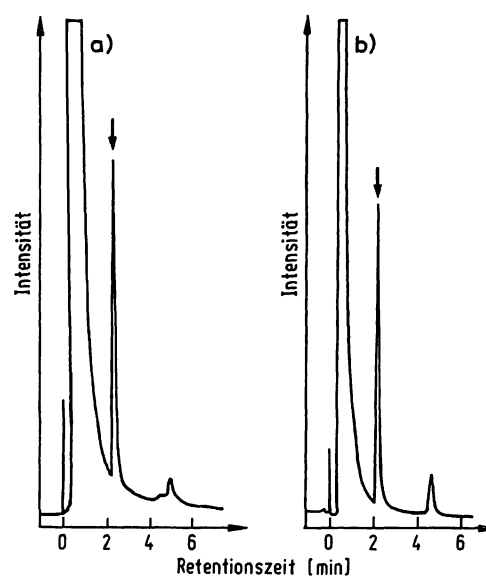


Abb. 4. Gaschromatogramm eines Serums von einer Secbutabarbitalvergiftung (174 µmol/l) an SP 2250 DA
a) ohne dünn-schichtchromatographische Vorreinigung.
b) nach dünn-schichtchromatographischer Vorreinigung.
↓ Secbutabarbital.

Bisacodyl, Carbamazepin, Carbocromen, Carbromal, Cetobemidon, Chlordiazepoxid, Chloroquin, Chlorpromazin, Chlorprothixen, Clofibrat, Clomethiazol, Codein, Cyclophosphamid, Dextran (5 ml), Dextromoramid, 2,2-Diethylallylacetamid, Diazepam, Digoxin, Diphenhydramin, Doxepin, Ethinamat, Ethosuximid, Fenetyllin, Fluphenazin, Furosemid, Gentamycin, Glafenin, Glibenclamid, Glutethimid, Haloperidol, Hyoscin-N-butylbromid, Imipramin, Indometazin, Levorphanol, Levorphanoltartrat, Meclozin, Mephentoin, Mesuximid, Methadon, Methamphetamin, Methaqualon, Methotrexat, Methyldopa, Methylpentynol, Methylstyryldibromhydantoin, Methypylon, Miroton®, Modenol®, Morphin, Neoplasmagel (5 ml), Nicotinamid, Nitrazepam, Nitrofurantoin, Noramidopyrini methansulfonates natrium, Norfenefrin, Normethadon, Oxazepam, Oxyphenbutazon, Paramethadion, Pethidin, Phenylethylmalondiamid, Phenformin, Pheniramin-p-amino-salicylat, Phenprocoumon, Phenylbutazon, Prazepam, Prednisolon, Primidon, Probenecid, Promethazin, Propylhexedrin geb. an Phenobarbital, Prothipendyl, Pyrithyldion, Reserpin, Spironolacton, Sulfadiazin, Sulfametoxydiazin, Sultiam, Tetracyclin, Thioridazin, Tilidin, Tolbutamid, Trifluorpromazin, Trimethadion, Valproinsäure.

Jeweils eine Tablette oder Dragée – bzw. 5 ml der Flüssigkeit – werden mit 10 ml Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) extrahiert. 2 µl des Extraktes, der die Pharmaka und die Tablettengrundsubstanz entsprechend ihrer Löslichkeit in dem Lösungsmittel enthält, werden in den Gaschromatographen injiziert. Die Registrierempfindlichkeit ist so gewählt, daß 0,85 nmol (200 ng) Hexobarbital Vollausschlag ergeben. Bei Ana-

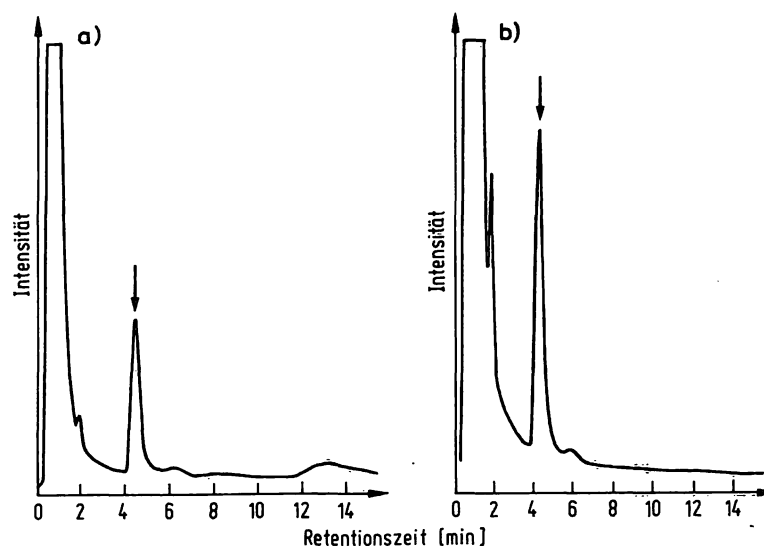


Abb. 5. Gaschromatogramm eines Serums von einer Secbutabarbitalvergiftung ($174 \mu\text{mol/l}$) an CDMS

a) ohne dünnschichtchromatographische Vorreinigung.

b) nach dünnschichtchromatographischer Vorreinigung. ↓ Secbutabarbital.

lysen an SP 2250 DA und CDMS werden falsch als „Barbiturat“ identifiziert: Acidum niflumicum, Glutethimid, Noramidopyrini methanosulfonas natrium, Oxyphenbutazon und Tolbutamid. Bei zusätzlicher Chromatographie an OV-101 wurden nur noch Glutethimid, das nicht sicher von Hexobarbital unterschieden werden kann, und Oxyphenbutazon als „Barbiturat“ identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit einer Störung durch Tolbutamid ist gering, da dieses Medikament kaum noch verordnet wird. Noramidopyrini methanosulfonas natrium kann außer Betracht bleiben, da es in vivo nicht unverändert nachweisbar ist. Der Zusatz von Reinsubstanzen zur Überprüfung der Spezifität hat orientierende Bedeutung, da die Metabolisierung in vivo unter verschiedenen Bedingungen (z. B. therapeuti-

sche Dosierung, chronische Applikation, gegenseitige Beeinflussung des Stoffwechsels) zu berücksichtigen ist. Da die Mehrzahl der Metabolite jedoch hydrophiler als die Ausgangssubstanz ist, dürften die meisten bei der Aufarbeitung abgetrennt werden oder sich gaschromatographisch wesentlich anders verhalten. So ergibt der Zusatz von Reinsubstanzen doch einen guten Überblick.

Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze werden jeweils 2 ml eines zufällig ausgewählten Serums mit je $4 \mu\text{g}$ eines oder mehrerer Barbiturate aufgestockt. Außerdem werden $0,17 \text{ nmol}$ (40 ng) Hexobarbital und 740 Bq (20 nCi) $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Hexobarbital zugesetzt. Je 1 ml der aufgestockten Probe wird getrennt aufgearbeitet und analysiert (Tab. 5). Die Methode erlaubt also Barbitu-

Tab. 4. Gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum.

Vergleich der Analyseergebnisse echter Proben: Messung vor und nach Dünnschichtchromatographie an 2 verschiedenen stationären Phasen unter Berücksichtigung der Wiederfindung von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Hexobarbital.

Barbiturat	Vor Dünnschichtchromatographie		Nach Dünnschichtchromatographie	
	SP 2250 DA	CDMS	SP 2250 DA	CDMS
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
Allobarbitol	48,5	—	42,8	39,4
Aprobarbital	126,1	—	120,4	116,6
Aprobarbital	33,3	—	26,2	29,5
Barbital	52,1	—	53,2	50,5
Cyclopal	—	15,8	14,1	14,9
Cyclopal	35,0	—	35,4	29,5
Pentobarbital	—	19,4	21,2	22,5
Pentobarbital	24,3	—	19,4	13,3
Phenobarbital	42,6	—	40,5	38,8
Secbutabarbital	23,1	—	31,1	28,7
Secobarbital	63,4	—	85,2	72,6
Secobarbital	18,9	—	14,3	15,1

Tab. 5. Gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum an SP 2250 DA.

Nachweisgrenze (3 s-Bereich bei Analyse von Sera, die mit 2 mg/l eines Barbiturates aufgestockt wurden) unter Berücksichtigung der Wiederfindung von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Hexobarbital.

Barbiturat	Anzahl der Analysen	3 s-Bereich
	n	($\mu\text{mol/l}$)
Allobarbitol	10	3,6
Amobarbital	10	3,1
Aprobarbital	9	1,7
Barbital	10	3,1
Butalbital	10	1,9
Cyclopal	9	2,1
Hexobarbital	9	3,9
Methylphenobarbital	10	6,9
Pentobarbital	8	3,4
Propallylonal	10	1,7
Secobarbital	10	5,0
Vinylbital	10	1,7

ratbestimmungen z. T. bis in den therapeutischen Bereich. Eine zu hohe Nachweisgrenze bei toxikologischen Analysen kann zu falschen Ergebnissen führen, da häufig mehrere Mischpräparate gleichzeitig eingenommen werden. Die Konzentration der einzelnen Pharmaka kann unter der (zu hohen) Nachweisgrenze liegen, obwohl es sich um eine Vergiftung handelt.

Praktikabilität

Die quantitative Bestimmung der Barbiturate im Serum mit Hilfe der Gaschromatographie hat bisher in Deutschland kaum Eingang in das klinisch-chemische Laboratorium gefunden. Das dürfte z. T. bedingt sein durch die ungenügende Zuverlässigkeit mancher Methoden, zum größten Teil jedoch durch die mangelnde Praktikabilität. Die von uns angegebene Methode liefert nach einfacher Aufarbeitung der Probe zuverlässige Ergebnisse. Das verwendete Gaschromatographiesystem erlaubt eine quantitative Bestimmung ohne Derivatbildung. Ohne den dünnstschichtchromatographischen Schritt kann eine Barbituratvergiftung in einer Stunde ausgeschlossen werden. Die Identifikation und quantitative Bestimmung erfordert für die einzelne Probe eine Stunde zusätzlich.

Diskussion

Im Laufe der Jahre sind verschiedene Aufarbeitungsverfahren zur Gewinnung geeigneter Extrakte für die gaschromatographische Bestimmung von Barbituraten im Serum angegeben worden, wie zum Beispiel Extraktion mit organischen Lösungsmitteln bei verschiedenen pH-Werten (19) und Chromatographie an Amberlite XAD-2 (20). Unsere ersten Versuche mit der säulenchromatographischen Reinigung verliefen unbefriedigend: Zu niedrige Wiederfindung, um auf einen radioaktiven Tracer verzichten zu können, ungenügende Abtrennung von Verunreinigungen für die gaschromatographische Analyse mit einem Flammenionisationsdetektor. Die gaschromatographisch noch reinsten Extrakte werden mit Chloroform erhalten. Um eine rasche Phasentrennung zu erreichen und um durch Wasserentzug die Pharmakon-Eiweißbindung zu lockern mit Verbesserung der Wiederfindung, wird vor der Extraktion mit dem organischen Lösungsmittel kalt gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt: Die Verwendung der Ammoniumsulfatlösung ergibt eine hohe Wiederfindungsrate, verhindert die Emulsionsbildung und liefert gaschromatographisch reinere Extrakte als die Verwendung von Chloroform allein.

Die Verwendung eines konstanten, beinahe neutralen pH-Wertes erlaubt die Erfassung nicht nur der sauren, sondern auch der neutral reagierenden Hypnotica. Es ist weniger zeitaufwendig und verlustreich als Extraktionen

mit verschiedenen pH-Werten und mehreren Transfer-schritten.

Die Barbiturate sind aufgrund ihrer polaren Gruppen für die Gaschromatographie nicht ideal geeignete Substanzen. Schon früh wurde versucht durch Derivatbildung die polaren Gruppen zu maskieren, um Adsorption und Zersetzung an der stationären Phase zu vermindern. Zunächst wurden verschiedene Methylierungsverfahren benutzt. Als Nachteile sind zu nennen:

- Entstehung uneinheitlicher Produkte,
- Zersetzung der Probe bei längerem Stehenlassen,
- Informationsverlust durch Bildung gleicher Methylderivate,
- Stabilisierung von Begleitverunreinigungen,
- Beeinträchtigung der Lebensdauer der stationären Phasen.

Andere Autoren empfehlen die Butylierung (10) oder Hexylierung (21). *Venturella* schlägt die Acetalbildung vor (22), von *Street* wird für die qualitative Analyse die Silylierung angegeben (23). Um in der klinisch-toxikologischen Routine möglichst einfach verfahren zu können, haben wir versucht, durch Verbesserung des gaschromatographischen Systems diesen zusätzlichen, schwierigen Analysenschritt der Derivatbildung zu vermeiden. Die Verwendung silanisierter Glassäulen, der Verzicht auf Glaswatte im Säuleneingang und die Benutzung besonders inerten Trägermaterials gestattet uns – bei Verwendung von 2% des Extraktes – die angegebenen geringen Barbituratmengen zu bestimmen. Die Nachweisgrenze wurde abgeschätzt an Hand des 3 s-Bereiches bei niedriger Konzentration. Die Bestimmung nach *Kaiser* (24) mittels Analyse von schlammstofffreien Sera ist nicht durchzuführen, da bei sehr niedrigen Konzentrationen die Barbiturate an den stationären Phasen eine deutlich merkbare Adsorption mit Zunahme der Retentionszeit zeigen. Der Zeitpunkt, zu dem die Größe des Meßsignals zu bestimmen ist, ist damit nicht genau definiert. Das Signal-Rausch-Verhältnis einer primären Standardlösung ergibt einen zu günstigen Wert, da Verunreinigungen der Serumextrakte unberücksichtigt bleiben.

Bei der Identifikation der Peaks ist die Zunahme der Retentionszeiten der Barbiturate mit abnehmender Konzentration zu beachten, was jedoch erst bei therapeutischen Blutspiegeln merkbar wird. Unabdingbar für den positiven Nachweis bleibt die gleichzeitige Injektion des vermuteten Barbiturats und der Probe (s. Methodik).

Danksagung

Herrn K. Petry und Herrn H. Lent danke ich für ihre zuverlässige Mitarbeit.

Literatur

1. Walker, J. T., Fisher, R. S. & McHugh, J. J. (1948), *Am. J. Clin. Pathol.* **18**, 451–461.
2. Schumann, G. B., Lauenstein, K., LeFever, D. & Henry, J. B. (1976), *Am. J. Clin. Pathol.* **66**, 823–830.
3. Brochmann-Hanssen, E. & Svendsen, A. B. (1962), *J. Pharm. Sci.* **51**, 318–321.
4. Svendsen, A. B. & Brochmann-Hanssen, E. (1962), *J. Pharm. Sci.* **51**, 494–495.
5. Vanden Heuvel, W. J. A., Haahti, E. O. A. & Horning, E. C. (1962), *Clin. Chem.* **8**, 351–359.
6. Janak, J. (1960), *Nature (London)* **185**, 684–686.
7. Fioreck, E. A. & Tietz, N. W. (1971), *Clin. Chem.* **17**, 1024–1027.
8. Mac Gee, J. (1971), *Clin. Chem.* **17**, 587–591.
9. Williams, A. J., Jones, T. W. G. & Cooper, J. D. H. (1973), *Clin. Chim. Acta* **43**, 327–332.
10. Greeley, R. H. (1974), *Clin. Chem.* **20**, 192–194.
11. Street, H. V. (1971), *Clin. Chim. Acta* **34**, 357–364.
12. Cieplinski, E. W. (1963), *Anal. Chem.* **35**, 256–257.
13. Truter, E. V. (1964), *J. Chromatogr.* **14**, 57–61.
14. Sunshine, I., Rose, E. & LeBeau, J. (1963), *Clin. Chem.* **9**, 312–316.
15. Külpmann, W. R. (1978), *Fresenius Z. Anal. Chem.* **290**, 155.
16. Külpmann, W. R., Siekmann, L. & Breuer, H. (1973), *J. Steroid Biochem.* **4**, 649–657.
17. Oellerich, M., Külpmann, W. R., Haeckel, R. & Heyer, R. (1977), *diese Z.* **15**, 353–358.
18. Copeland, B. E. (1957), *Am. J. Clin. Pathol.* **27**, 551–558.
19. Sunshine, I. (1963), *Am. J. Clin. Pathol.* **40**, 576–582.
20. Machata, G. & Vycudilik, W. (1975), *Arch. Toxikol.* **33**, 115–122.
21. Giovanniello, T. J. & Pecci, J. (1976), *Clin. Chim. Acta* **67**, 7–13.
22. Venturella, V. S., Gualario, V. M. & Lang, R. E. (1973), *J. Pharm. Sci.* **62**, 662–668.
23. Street, H. V. (1969), *J. Chromatogr.* **41**, 358–366.
24. Kaiser, H. (1965), *Z. Anal. Chem.* **209**, 1–18.

Priv.-Doz. Dr. W. R. Külpmann
Institut für Klinische Chemie
Karl-Wiechert-Allee 9
3000 Hannover 61